

ANÁLISE *IN VITRO* DA INTERNALIZAÇÃO DE BACILLUS CALMETTE-GUERIN RECOMBINANTE (rBCG-GFP) EM CÉLULA DE MELANOMA ORAL CANINO

MARIA EDUARDA EHLERT¹; VALENTINA GESSINGER FERREIRA²; NIELI SILVA DE SOUZA³; BRUNA SILVEIRA PACHECO⁴; THAÍS LARRÉ OLIVEIRA BOHN⁵; TIAGO VEIRAS COLLARES⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Biotecnologia do Câncer –
dudaaehler1@gmail.com;

²Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Biotecnologia do Câncer
valentinagessinger@gmail.com;

³Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Biotecnologia do Câncer -
nielle.pharias@gmail.com;

⁴Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Biotecnologia do Câncer -
pacheco.sbruna@gmail.com;

⁵Universidade Federal de Pelotas - Laboratório de Vacinologia – thais.larre@ufpel.edu.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Biotecnologia do Câncer -
tiago.collares@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é um tumor maligno que surge de células pigmentares, os melanócitos, que podem ter origem de superfícies cutâneas e mucosas (YDE et al., 2018). Neste sentido, os melanomas de mucosa oral são um tipo de tumor raro e agressivo que corresponde a 0,2% a 8,0% de todos os melanomas (NISI et al., 2021). Comparados aos melanomas cutâneos, os melanomas de mucosa apresentam características mais agressivas, incluindo estágios avançados de estadiamento tumor-nodal-metástase (TNM) no momento do diagnóstico, alta taxa de crescimento e alto potencial metastático (MAO et al., 2021). O Brasil apresenta a maior taxa de incidência da América do Sul, de 3,6 casos por 100 mil habitantes, e a segunda maior taxa de mortalidade, de 1,5 morte por 100 mil habitantes (INCA, 2022).

Em comparação, o melanoma oral canino compartilha o mesmo curso clínico mortal e tratamento do que o melanoma oral humano. Os cães podem naturalmente desenvolver câncer e assim mimetizar de modo mais equivalente, do que camundongos, o início e a progressão do tumor. Ainda, a partir de análises comparativas de genomas entre humano-cães foram identificados genes clinicamente relevantes associados a progressão metastática (PALMA et al., 2021). Ademais, cães compartilham o mesmo ambiente que humanos, portanto além de semelhanças genéticas encontram-se paralelos influenciados pelo meio que ambos se encontram, tornando o câncer, uma doença multifatorial, com um modelo de alta semelhança biológica.

Assim sendo, ainda não existe tratamento efetivo para melanoma oral metastático para humanos, tampouco para cachorros (PALMA et al., 2021). Obstante, para humanos, é comumente baseada na excisão cirúrgica do tumor primário, complementada pela radioterapia, com quimioterapia e imunoterapia atuando como complementos (BOULAADAS et al., 2007). Em contrapartida, avanços em imunoterapias têm oferecido abordagens terapêuticas promissoras para pacientes com melanoma de mucosa avançado (MAO et al., 2021).

Desenvolvido inicialmente para vacinação contra a tuberculose, o Bacillus Calmette-Guerin (BCG) é uma cepa de *Mycobacterium bovis* que foi atenuada *in vitro* ao longo de 13 anos (OLIVEIRA et al., 2017). Atualmente, cepas de BCG selvagem e recombinantes são usadas em combinação com agentes

quimioterapêuticos e imunoterapêuticos para potencializar a resposta imune e a regressão tumoral (STEWART et al., 2011). O BCG já tem sido usado como agente imunoterapêutico padrão para o carcinoma urotelial de superfície (BENETEZ et al., 2019), e ainda possui resultados promissores para neoplasias, como leucemia, câncer de pulmão e melanoma cutâneo (CARDILLO et al., 2021).

Desse modo, o objetivo desse estudo foi realizar uma análise *in vitro* sobre a capacidade de internalização do BCG em células de melanoma oral canino utilizando como ferramenta para visualização o microscópio confocal de varredura a laser.

2. METODOLOGIA

2.1. Cultivo Celular

A linhagem celular de melanoma oral canino - CMDG5 - foi cultivada em meio Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). O cultivo celular foi mantido em incubadora umidificada em condições controladas de 37 °C e 5% de CO₂. Foi utilizada para a semeadura das células uma placa de 12 poços, em que 24 horas previamente ao plaqueamento foi assentada uma lamínula circular de vidro ao fundo da placa. A fim de aumentar a adesão das células à lamínula, a mesma foi tratada com Poli-L-Lisina 0,01%. A semeadura ocorreu em densidade de 1x10⁵ células por poço e foi mantida em estufa por 24 horas para crescimento em monocamada.

2.2. Cultivo de Bacillus Calmette-Guerin - BCG

A cepa de BCG recombinante expressando a proteína verde fluorescente (BCG-GFP) foi cedida pelo Laboratório de Vacinologia da Universidade Federal de Pelotas e cultivado em Middlebrook 7H9 Broth suplementado por OADC, Tween 20 a 80% e antibiótico canamicina. O cultivo foi mantido em estufa a 37 °C em torno de 4 a 5 dias, até que o cultivo chegasse em densidade óptica de 0.6 a 0.8, indicando a fase exponencial de crescimento da bactéria.

2.3. Sensibilização de célula de melanoma oral canino com BCG

Após as 24 horas de plaqueamento das células cancerígenas e a densidade óptica do BCG alcançar valores entre 0.6 e 0.8, o cultivo de Bacillus Calmette-Guerin foi colocado em contato ao cultivo de células na concentração de 1.000 bactérias para cada célula e incubada *overnight* a 37 °C e 5% de CO₂.

2.4. Fixação celular em lamínula e utilização de corantes celulares

O cultivo celular sensibilizado pelo cultivo de BCG foi fixado com Formaldeído 3,7% e Triton X-100, posteriormente as células passaram por lavagens com PBS 1x e foram submetidas a corantes fluorescentes, portanto todo o procedimento foi feito sem a exposição de luz. Foram utilizados 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) para a coloração azul do núcleo da célula e Texas Red para a coloração vermelha do citoesqueleto da célula, ambos corantes foram obtidos pela Life Technologies e utilizados conforme o protocolo do fabricante.

2.5. Configuração do microscópio confocal de varredura a laser.

Para observação da internalização, foi usado microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS SP8 em aumento de 100x. O escaneamento foi realizado usando os lasers 405 nm, 488 nm e 552 nm para visualização da fluorescência de DAPI, GFP e Texas Red, respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

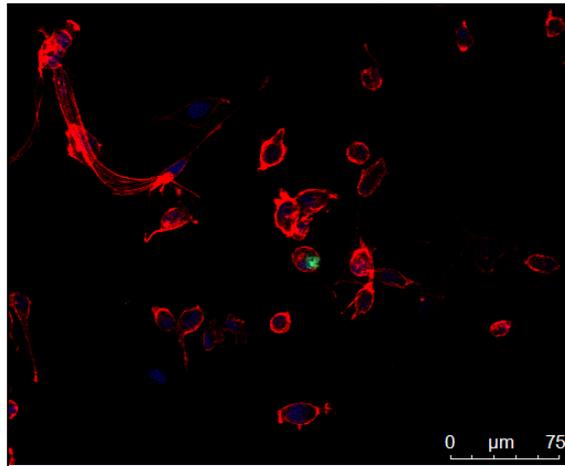


Figura 1: Imagem obtida por microscopia confocal de células da linhagem CMGD5 tratadas com BCG-GFP. Em azul, vermelho e verde, fluorescência do núcleo corado com DAPI, do citoesqueleto com Texas Red e de rBCG expressando GFP, respectivamente.

A partir da análise das imagens geradas em microscopia confocal, foi possível observar a internalização do BCG-GFP na célula CMGD5, conforme demonstrado na Figura 1. A fim de preservar futuras publicações do grupo, as imagens em diferentes planos, que confirmam a internalização, serão mostradas somente na apresentação oral. Ainda vale ressaltar que a GFP é conhecida como um gene da proteína verde fluorescente que provém da espécie de água-viva *Aequorea victoria*. Esse gene pode ser introduzido, a partir de engenharia genética, em Micobactérias e ainda fluorescer na cor verde em luzes de no máximo 510 nm (KREMER, et al, 1995).

Embora intensamente estudado, ainda não está claro por quais mecanismos específicos o BCG permeia a imunidade tumoral. Portanto, o BCG tem sido usado como estimulante imunológico inespecífico (BENITEZ et al. 2019), onde o que sabe-se é que o efeito antitumoral é mediado pela ativação do sistema imunológico local e sistêmico e subsequente uma resposta inflamatória, podendo atuar na modulação do microambiente tumoral (LARSEN et al., 2019).

Nessa perspectiva, a internalização do BCG ativa diversas rotas metabólicas a partir do Toll-like receptor 2 (TLR2) e Toll-like receptor 4 (TLR4), tais como interleucinas 1, 2, 6, 8 e 12, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Interferon-gama (IFN- γ) que conseqüentemente levam a uma resposta do sistema imunológico inato e adaptativo. Ainda, os TLR2 e TLR4 são responsáveis pela secreção do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) que é um contribuinte para apoptose em células cancerígenas (LARSEN et al., 2019).

Conforme recomendado nas National Comprehensive Cancer Network Guidelines (NCCN), a imunoterapia intralesional do BCG (IL-BCG) é uma opção de tratamento altamente eficiente e econômica para melanoma intransitório em estágio III inoperável (KREMENOVI, et al., 2020). Ainda, KREMENOVI et al. (2020), menciona que IL-BCG demonstrou grande eficácia na regressão de lesões de melanoma metastático, por conseguinte mesmo que tais dados são referentes a melanomas cutâneos, compreende-se um forte e importante indício que melanomas de mucosa, devido a sua origem similar, possuem ação semelhante.

Portanto, a avaliação *in vitro* da internalização do BCG em células de melanoma oral canino, um modelo biológico com um alto grau de semelhança

genética com humanos, se torna um passo significativamente importante para avanços na imunoterapia com BCG em melanomas de mucosa oral, além de uma melhor compreensão do mecanismo de ação do BCG e sua otimização para melhores respostas imunológicas antitumorais.

4. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos, pode-se concluir que as células de melanoma oral canino possuem potencial para a internalização de BCG, criando uma nova perspectiva de tratamento para esse tipo de câncer. Contudo, demais estudos devem ser feitos a fim de compreender de modo mais completo o mecanismo da internalização e seus benefícios.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENITEZ, M.L.R; BENDER, C.B; OLIVEIRA, T.L; SCHACHTSCHNEIDER, K.M; COLLARES, T; SEIXAS, F.K. Mycobacterium bovis BCG in metastatic melanoma therapy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2019.
- BOULAADAS, M; BENAZZOU, S; MOURTADA, F; SEFIANI, S; NAZIH, N; ESSAKALLI, L; KZADRI, M. Primary oral malignant melanoma. **Journal of craniofacial surgery**, 2007.
- CARDILLO, F; BONFIM, M; SOUSA, P.S.V; MENGEL, J; BRANCO, L.R.R.C; PINHO, R.T. Bacillus Calmette–Guérin Immunotherapy for Cancer. **Vaccines**, 2021.
- Instituto Nacional do Câncer - INCA. **Diagnóstico Precoce Do Câncer De Boca**. Ministério da Saúde. Online. Rio de Janeiro, 2022. Acessado em 04 set 2023. Online. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/livro-diagnostic-o-precoce-cancer-boca-2022.pdf>
- KREMER, L; BAULARD, A; ESTAQUIER, J; GODEFROY, O.P; LOCHT, C. Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. **Molecular microbiology**, 1995.
- LARSEN, E.S; JOENSEN, U.N; POULSEN, A.M; GOLETTI, D; JOHANSEN, I.S. Bacillus Calmette–Guerin immunotherapy for bladder cancer: a review of immunological aspects, clinical effects and BCG infections. **Journal of pathology, microbiology and immunology**, 2019.
- MAO, L; QI, Z; ZHANG, L; GUO, JUN; SI, L. Immunotherapy in Acral and Mucosal Melanoma: Current Status and Future Directions. **Frontiers in Immunology**, 2021.
- NISI, M; IZZETTI, R; GENNAI, S; PUCCI, A; LENZI, C; GRAZIANI, F. Oral Mucosal Melanoma. **Journal of Craniofacial Surgery**, 2022.
- OLIVEIRA, T.L; RIZZI, C; DELLAGOSTIN, O.D. Recombinant BCG vaccines: molecular features and their influence in the expression of foreign genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2017.
- PALMA, S.D; MCCONNELL, A; VERGANTI, S; STARKEY, M. Review on Canine Oral Melanoma: An Undervalued Authentic Genetic Model of Human Oral Melanoma?. **Sage journals**, 2021.
- STEWART, J.H; LEVINE, E.A. Role of bacillus Calmette–Guérin in the treatment of advanced melanoma. **Expert reviews of anticancer therapy**, 2011.
- YDE, S.S; SJOEGREN, P; HEJE, M.; STOLLE L.B. Mucosal Melanoma: a Literature Review. **Current Oncology Reports**, 2018.